

睾酮与 TBTC 抑制斑马鱼卵巢发育的分子机制^{*}

饶剑军, 李英文, 张群芳, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校生物活性物质工程研究中心 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:为探讨雄激素与三丁基锡对鱼类卵巢发育和配子发生的影响及其分子差异,分别用 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 睾酮(T)、 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三丁基氯化锡(TBTC)单独处理以及 T、TBTC(两者含量均为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)联合处理对斑马鱼(*Danio rerio*)雌鱼进行了 90 d 暴露。组织学结果表明:与对照相比,经 T、TBTC 单独处理的斑马鱼成熟系数(GSI)下降,卵巢发育受阻,卵子发生抑制,且 TBTC 单独处理的斑马鱼发育后期的卵母细胞大量凋亡;经 T、TBTC 联合处理的斑马鱼卵母细胞尽管在发育后期发生凋亡,但仍有少量卵母细胞持续发育,GSI 值明显升高。定量 PCR 结果表明:T 和 TBTC 单独处理都能显著下调雌激素(E2)合成酶基因 *cyp19a* 及其上游调控基因 *foxl2* 的表达($p<0.05$),而两者联合处理则显著上调 *cyp19a* 和 *foxl2* 基因表达($p<0.05$);T 单独处理的斑马鱼雄激素合成酶基因 *P450 11 β* 的表达显著升高($p<0.05$),而 TBTC 单独处理使该基因表达显著下降($p<0.05$),T、TBTC 联合处理对该基因表达无显著影响;T、TBTC 单独处理均不影响孕激素合成酶基因 *20 β HSD* 的表达,但 T、TBTC 联合处理却显著上调该基因的表达($p<0.05$)。研究认为 T、TBTC 抑制斑马鱼卵巢发育和卵子发生的机制可能既相似又有所差异。

关键词:睾酮;三丁基氯化锡;斑马鱼;卵巢发育;分子差异

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)02-0032-05

内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)能严重影响鱼类的生殖功能,干扰体内激素的分泌,造成生殖和遗传方面的不良后果^[1-2]。大量研究表明,EDCs 暴露会严重损害鱼类的性腺发育和配子发生,引起鱼类产生明显的雌、雄性化效应^[3-5]。其中,有机锡化合物如三丁基锡(Tributyltin, TBT)具有明显的雌性抑制效应^[6],它在水中的主要存在形式为三丁基氯化锡(Tributyltin chloride, TBTC)^[7]。TBTC 应用广泛且难降解,易富集于鱼体;它对海洋生物具有毒性作用,特别是存在生殖毒性,因而被人们高度关注^[8]。对雌性鱼类的研究发现,TBT 暴露能扰乱鱼类内源性激素平衡、抑制卵巢发育^[9-10]。TBT 具体的作用机制尚不十分明确,Shimasakir 等人^[11]认为 TBT 是芳香化酶抑制剂,可导致雌激素水平降低,卵巢发育被抑制;但 Nakanishi 等人认为 TBT 可能通过抑制芳香化酶基因 *cyp19a* 的转录来抑制雌激素合成^[12]。因此,关于 TBT 的作用机制还存在很大争议。

与 TBT 效应相似,外源雄激素也可通过抑制卵巢中 *cyp19a* 基因的表达,降低血清中雌二醇(17β -estradiol, E2)的水平,进而导致卵巢发育被抑制,雌鱼雄性化,甚至发生性反转^[13-15]。其中,睾酮(testosterone, T)对于维持鱼体内性激素的平衡至关重要,它是鱼类雌激素 E2 和雄激素 11-酮基睾酮(11-ketotestosterone, 11-KT)共同的前体;同时血清中的 T 也可通过负反馈机制影响卵巢发育^[16-17]。

雄激素和 TBT 都具有雌性抑制效应,但二者功能截然不同,故两者分子作用机制可能存在一定差异。为此,本研究用 T、TBTC 单独处理及两者联合处理对 120 d 龄斑马鱼雌性成鱼进行了 90 d 暴露。通过组织学和荧光定量 PCR 的方法,研究两种药物对斑马鱼成鱼卵巢发育和卵子发生的影响,并探讨了其中可能的分子差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料 with 处理

实验用斑马鱼雌性成鱼(AB 系 120 d 龄)为研究组自行繁殖获得,体质量为 $(0.500\pm0.051)\text{ g}$,处理前用曝气除氯后的自来水暂养于恒温循环水养殖系统中。实验设置 3 个处理组和 1 个对照组,其中两个单独处理组分别仅含有 T、TBTC,含量均为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;联合处理组中同时含有 T、TBTC,含量均为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,并加入 0.05% DMSO 作为助溶剂;对照组中仅加入 0.05% DMSO 而不含 T、TBTC。在各实验组所用玻璃缸(20 L)中随机放

入实验鱼 15 尾;每日喂食 3 次、换水 1 次,连续处理 90 d。所有鱼缸连续适量充气,水温控制在 $(27\pm1)^{\circ}\text{C}$,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。处理 90 d 后,将斑马鱼解剖取出卵巢。每组取 6 尾斑马鱼卵巢用于组织学观察,同时每组取 6 尾鱼卵巢用于成熟系数(Gonadosomatic index,GSI)计算和总 RNA 的提取。上述实验共重复 3 次。

1.2 组织学研究

对实验鱼卵巢用 4% PFA(pH 值为 7.4)于 4℃固定 24 h。经梯度酒精脱水和二甲苯透明,60℃石蜡包埋,随后进行 5 μm 连续切片,HE 染色,中性树胶封片,并在生物显微镜(DM2700 M 光学显微镜,德国徕卡)下观察拍照。

1.3 荧光定量 PCR

用 Trizol 从实验鱼新鲜卵巢中提取总 RNA,保存于-80℃条件下。总 RNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。取 1 μg 总 RNA 按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书去除基因组 DNA 并进行反转录,合成第一链 cDNA,-20℃下保存。从 GenBank 查得斑马鱼基因 *foxl2*、*cyp19a*、*P450 11β*、*20β HSD* 及看家基因 *β-actin*、*eflα* 序列(表 1),用 Primer-BLAST 设计引物并验证(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),引物通过 Invitrogen 公司合成。

荧光定量 PCR 反应及检测在 Bio-rad IQ5(Bio-Rad)上进行,为保证结果的准确性,对每一样品技术性重复 3 次。反应体系(20 μL)构成:1 μL cDNA(第一链 cDNA 稀释 5 倍),10 μL iTaq™ Universal SYBR® Green(×2),0.5 μL 正向引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),0.5 μL 反向引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),8 μL RNase Free ddH₂O。实时定量采用两步 PCR 扩增法:95℃、10 s,预变性;95℃、5 s,60℃、30 s,循环 45 次。参照 Goll 等运用的相对标准曲线法对相对定量的结果进行分析^[18]。在本研究预实验中,发现药物处理不影响 *eflα* 基因的表达,同时 *eflα* 技术性重复效果比 *β-actin* 更稳定,因此选用 *eflα* 做内参进行相关统计。

1.4 GSI 计算

GSI 计算公式为“成熟系数=(性腺质量/体重)×100%”。

1.5 数据处理与分析

用 SPSS13.10 软件对实验结果进行方差分析和多重比较,差异显著性水平为 $p<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 对卵巢发育的影响

图 1 显示暴露处理 90 d 后,与对照组相比,T、TBTC 单独处理组中斑马鱼 GSI 值都显著降低($p<0.05$),卵巢的发育受到抑制;T、TBTC 联合处理组中斑马鱼 GSI 值显著上升($p<0.05$),卵巢质量明显增加。

2.2 对斑马鱼卵巢发育和卵子发生的影响

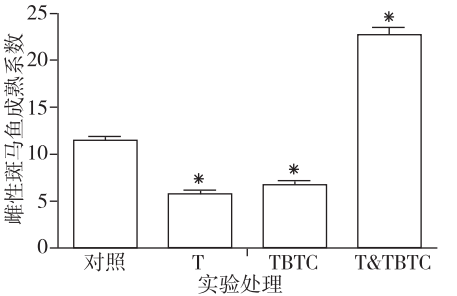
组织切片结果显示,对照组卵巢被大量的卵黄发生中期(MV 期)与完全生长期(FG 期)的卵母细胞占据,同时也有处于不同发育时期的卵母细胞存在(封二彩图 2a)。T 暴露 90 d 后卵巢中 MV 和 FG 期卵细胞完全消失,只存在卵黄发生早期(EV 期)和卵黄生成前的卵母细胞(封二彩图 2b)。TBTC 处理组卵巢中 FG 期卵母细胞凋亡,卵母细胞凋亡后的细胞壁、细胞质溶解在一起(封二彩图 2c)。T 和 TBTC 联合处理卵巢中处于发育后期的卵母细胞大量凋亡,但是仍存在一定数量的发育后期的卵母细胞(封二彩图 2d)。

2.3 对 *foxl2*、*cyp19a*、*P450 11β* 和 *20β HSD* 基因表达水平的影响

荧光定量 PCR 结果表明,与对照相比,T、TBTC 单独处理组 *foxl2* 和 *cyp19a* 基因表达均显著下调

表 1 引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study		
引物名称	引物序列(5'~3')	序列号
foxl2-F	GCTGCAGCACCTCCGGTGAC	BC116585
foxl2-R	CCGCGCGTGTAGTGCAGAGT	
cyp19a-F	CGGATCGGGTCCTCGGTCGT	KF296362
cyp19a-R	CGGCTGCTGCGACAGGTTGT	
P450 11β-F	CTGGGCCACACATCGAGAG	FJ713105
P450 11β-R	AGCGAACGGCAGAAATCC	
20β HSD-F	TCATGCTCTTCTGCCGATAC	EU918603
20β HSD-R	CAAGGGACTTCTTGCTGACA	
β-actin-F	TGTGGATCAGCAAGCAGGAG	AF057040
β-actin-R	GCCATACAGAGCAGAAGCCA	
eflα-F	GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA	KC508618
eflα-R	GCTGCTCCAGGTTTGCTAT	



注: * 代表差异显著($p<0.05$),下同。

图 1 T 与 TBTC 暴露 90 d 对雌性斑马鱼成熟系数的影响

Fig. 1 Gonadosomatic index of female zebrafish exposed to T and TBTC for 90 days

($p < 0.05$), 而 T 和 TBTC 联合处理组中两者则均显著上调($p < 0.05$)(图 3a、b); 同时, T 显著上调、TBTC 显著下调 *P450 11 β* 基因的表达($p < 0.05$), T、TBTC 联合处理组中该基因表达无显著变化(图 3c); T、TBTC 单独处理对 *20 β HSD* 基因的表达影响不显著, 但两者联合处理则显著上调该基因的表达($p < 0.05$)(图 3d)。

3 讨论

已有研究发现, 甲基睾酮(Methyltestosterone, MT)和 TBT 均能抑制鱼类卵子发生, 诱导卵母细胞凋亡, 使 GSI 降低^[19-20]。本研究结果显示, T、TBTC 单独处理也能显著抑制斑马鱼卵巢发育($p < 0.05$), 并抑制其中的卵子发生, 导致发育后期卵母细胞消失或者凋亡, 与 MT 和 TBT 单独处理的结果一致。与 T、TBTC 单独处理相似, 在两者联合处理组中, 斑马鱼雌性卵巢发育后期卵母细胞也发生了大规模的细胞凋亡, 而早期卵母细胞所受影响较小。不同之处在于, 在 T、TBTC 联合处理组中仍存在相当数量并未发生凋亡的发育后期卵母细胞。与之相对应的是, T、TBTC 联合处理组的 GSI 值显著升高($p < 0.05$), 暗示两者的联合处理促进斑马鱼卵巢发育, 而这与组织学观察结果截然不同。可以推测, T、TBTC 联合处理组中雌性斑马鱼 GSI 值升高可能是卵母细胞凋亡和卵母细胞持续发育的共同结果, 但其中内在的原因还有待研究。

内源雌激素和雄激素的平衡对鱼类性腺发育至关重要^[10-15]。这种平衡依赖于类固醇激素合成酶, 特别是由 *cyp19a* 基因编码的芳香化酶的作用^[21]。相关研究表明, 外源雄激素和 TBT 均可通过下调 *cyp19a* 基因的表达, 降低血清中 E2 的水平, 从而抑制卵巢发育^[22-24]。本研究发现, T、TBTC 单独处理不仅能显著降低斑马鱼 *cyp19a* 基因的表达($p < 0.05$), 还能抑制该基因上游调控因子 *foxl2* 的表达, 并最终抑制内源 E2 的合成。因此可以推测: *cyp19a* 的表达显著下调可能是 T、TBTC 单独处理导致的早期卵母细胞同步化与后期卵母细胞凋亡的原因。然而与单独处理的结果截然不同, T、TBTC 联合处理组中 *foxl2* 和 *cyp19a* 基因的表达明显上调, 暗示内源 E2 水平上升。至于上升的 E2 水平是否也有可能诱导卵母细胞凋亡, 在目前有关哺乳类的研究中已经发现, E2 能诱导小鼠卵母细胞发生凋亡^[25]; 而对斑马鱼的研究也发现, $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 能导致发育后期(MV 和 FG 期)卵母细胞大规模凋亡^[26]。尽管目前并没有内源 E2 水平上升诱导鱼类卵母细胞凋亡的相关报道, 但有理由推测, 雌性血清中雌激素水平过低或者过高可能都将严重抑制卵巢发育和卵子发生。

T、TBTC 单独处理不仅影响雌激素的合成, 对雄激素的合成也有较大影响。P450 11 β 是 T 向 11-KT 转化的关键酶^[27], 在有关青鳉(*Oryzias melastigma*)的研究中发现 E2 能抑制 *P450 11 β* 基因的表达^[28]。本研究中, T 能诱导 *P450 11 β* 基因表达上调, 这可能是因为内源雌激素水平下降所致。TBT 由于自身复杂的生理效应, 既可抑制荷斯坦奶牛(*Holstiae vaccas*)肾上腺细胞中 P450 11 β 蛋白的活性, 也能抑制 *P450 11 β* 基因的表达^[29]。因此可以推测, TBTC 单独处理也可能产生相似的效应下调卵巢中 *P450 11 β* 基因的表达。至于 T、TBTC 联合处理对 *P450 11 β* 基因表达无显著影响, 则表明了两种药物对 *P450 11 β* 基因的调控呈拮抗效应。

在鱼类卵子生长和成熟过程中, 存在着从合成 E2 向合成孕激素 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮($17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP)迅速转移的模式, 进而控制卵子生长和成熟^[30]。相关研究也表明, 血浆中 DHP 水平上升能促进斑马鱼卵母细胞持续成熟与排卵, 而 *20 β HSD* 则是合成 DHP 的关键酶^[31-32]。本研究发现 T、TBTC 单独处理均不影响斑马鱼 *20 β HSD* 基因的表达, 而两者联合处理却显著上调 *20 β HSD* 的表达($p < 0.05$)。这一结果暗示联合处理组斑马鱼血清中 DHP 水平可能上升, 并促进卵母细胞持续发育和成熟。这可能就是在联合处理组中仍能观察到发育后期卵母细胞的原因。由于在 T、TBTC 联合处理组中雌激素和孕激素水平可能都较

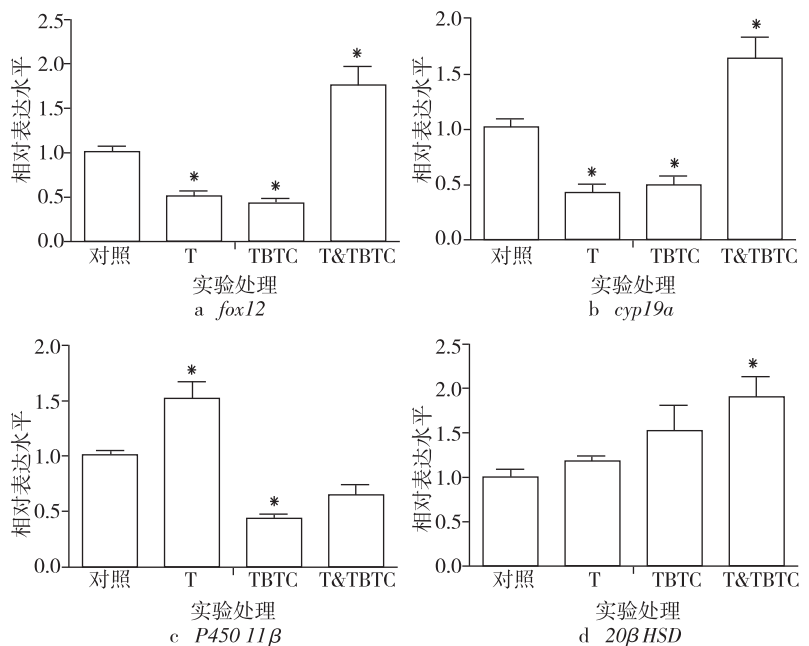


图 3 T 与 TBTC 暴露对斑马鱼 *foxl2*、*cyp19a*、*P450 11 β* 和 *20 β HSD* 基因表达的影响
Fig. 3 Influences of T and TBTC on *foxl2*, *cyp19a*, *P450 11 β* , and *20 β HSD* genes expressions in zebrafish

高,因此在联合处理组斑马鱼卵巢中可同时观察到卵母细胞凋亡和卵母细胞持续发育的现象,这与 T 和 TBTC 单独处理时的情况截然不同。

总之,本研究认为 T 和 TBTC 可能通过既相似又有所差异的机制来抑制斑马鱼卵巢发育和卵子发生。

参考文献:

- [1] Halldin K. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail[J]. Domestic animal endocrinology, 2005, 29(2): 420-429.
- [2] Brander S M, Connon R E, He G C, et al. From omics to otoliths: responses of an estuarine fish to endocrine disrupting compounds across biological scales[J]. Endocrine Disruption Across Biological Scales, 2013, 8(9): 1-15.
- [3] Lee P Y, Lin C Y, Chen T H. Environmentally relevant exposure of 17 α -ethinylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 85(2): 338-343.
- [4] Fu Z, Jin Y, Shu L, et al. Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 254-260.
- [5] Si J L, Li P, Xin Q B, et al. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride reduces sperm count and quality in mice[J]. Environmental Toxicology, 2015, 30(1): 44-52.
- [6] Mortensen A S, Arukwe A. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(3): 431-441.
- [7] 米兆娟, 李杰. 三丁基氯化锡对哺乳动物生殖毒性及作用机制[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(3): 364-366.
Mi Y J, Li J. Tributyltin chloride toxicity to mammalian reproduction and mechanism [J]. Chinese Journal of Public Health, 2007, 23(3): 364-366.
- [8] 张纪亮. 三丁基锡对褐菖鲉性腺发育影响及其机制的初步研究[D]. 福建厦门: 厦门大学, 2007.
Zhang J L. Effect of tributyltin on *sebastiscus marmoratus* gonad development and its mechanism study [D]. Xiamen Fujian: Xiamen University, 2007.
- [9] McGinnis C L, Crivello J F. Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish[J]. Aquatic toxicology, 2011, 103(1): 25-31.
- [10] Zhang J L, Zuo Z H, Xiong J L, et al. Tributyltin exposure causes lipotoxicity responses in the ovaries of rockfish, *Sebastiscus marmoratus* [J]. Chemosphere, 2013, 90(3): 1294-1299.
- [11] Shimasaki Y, Kitano T, Oshima Y, et al. Tributyltin causes masculinization in fish[J]. Environ Toxicol Chem, 2003, 22(1): 141-144.
- [12] Nakanishi T, Nishikawa J, Hiromori Y, et al. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(10): 2502-2516.
- [13] Pawlowski S, Sauer A, Shears J A, et al. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay[J]. Aquatic toxicology, 2004, 68(3): 277-291.
- [14] Gao J, Liu S, Zhang Y, et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on transcriptome, gonadal histology and sex steroid hormones in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2015, 15: 20-27.
- [15] Lee C H, Hur S W, Na O S, et al. Induction of primary male in juvenile red spotted grouper *Epinephelus akaara* by immersion of 17 α -methyltestosterone [J]. Development & Reproduction/Balsang'gwa saengsig, 2014, 18(3): 127.
- [16] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. Aquaculture, 2002, 208(3): 191-364.
- [17] 张吉强, 蔡文琴. 脑内芳香化酶表达的定位、调控及意义 [J]. 生理科学进展, 2001, 32(2): 107-111.
Zhang J Q, Cai W Q. Aromatase expression in the brain of the positioning, regulation and significance [J]. Progress in Physiological Sciences, 2001, 32(2): 107-111.
- [18] Goll R, Olsen T, Cui G, et al. Evaluation of absolute quantitation by nonlinear regression in probe-based real-time PCR [J]. BMC bioinformatics, 2006, 7(1): 1-11.
- [19] 赵春刚, 范鹏, 刘奕, 等. 甲基睾酮对雌性斑马鱼性腺发育的抑制作用 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 41(12): 70-74.
Zhao C G, Fan P, Liu Y, et al. Methyltestosterone inhibition of gonadal development in female zebrafish [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 41(12): 70-74.
- [20] Zhang J, Zuo Z, Chen Y, et al. Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (*Sebastiscus marmoratus*) [J]. Aquatic toxicology, 2007, 83(3): 174-179.
- [21] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. Endocr Rev, 1994, 15(3): 342-355.
- [22] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 56: 1-5.
- [23] 吴鹏. 三丁基锡对孔雀鱼性征和生殖的影响及机制研究 [D]. 山东青岛: 中国海洋大学, 2013.
Wu P. Effects and mechanisms of tributyltin on sexual

- characteristics and reproduction of *Poecilia reticulata* [D]. Qingdao Shandong: Ocean University of China, 2013.
- [24] Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, et al. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 155(1): 31-62.
- [25] Wang C, Roy S K. Development of primordial follicles in the hamster: role of estradiol-17 β [J]. Endocrinology, 2007, 148(4): 1707-1716.
- [26] 郭学鸣, 李英文, 尹盼, 等. EE2 抑制斑马鱼卵巢发育和卵母细胞发生[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2015, 32(3): 30-34.
- Guo X M, Li Y W, Yin P, et al. The inhibition of 17 α -ethynylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2015, 32(3): 30-34.
- [27] Xu H, Yang J, Wang Y, et al. Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Aquatic Toxicology, 2008, 88(1): 1-8.
- [28] Ye T, Kang M, Huang Q, et al. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 146: 115-126.
- [29] Yamazaki T, Shimodaira M, Kuwahara H, et al. Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action[J]. Steroids, 2005, 70(14): 913-921.
- [30] Sakai N, Iwamatsu T, Yamauchi K, et al. Influence of follicular development on steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle in response to exogenous substrates[J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 71(3): 516-523.
- [31] Zhu Y, Liu D, Shaner Z C, et al. Nuclear progesterin receptor (Pgr) knockouts in zebrafish demonstrate role for Pgr in ovulation but not in rapid non-genomic steroid mediated meiosis resumption[J]. Frontiers in Endocrinology, 2015, 6: 37.
- [32] Tokumoto T, Yamaguchi T, Ii S, et al. *In vivo* induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish[EB/OL]. (2011-09-28) [2015-08-05]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025206>.

Animal Sciences

Mechanisms Involved in the Inhibition of Zebrafish (*Danio rerio*) Ovarian Development by Testosterone and Tributyltin Chloride

RAO Jianjun, LI Yingwen, ZHANG Qunfang, LIU Zhihao

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: To investigate the influences and the differential mechanisms of androgen and tributyltin chloride on fish ovarian development and gametogenesis, female zebrafish (*Danio rerio*) adults were exposed to testosterone (T, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), tributyltin chloride (TBTC, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and their combination for 90 days. Histological results revealed that, In T and TBTC treated groups after exposure, the gonadosomatic index (GSI) dropped significantly compared to the control, indicating suppressed ovarian development and oogenesis of the fish. TBTC (while not the T) induced apoptosis in vitellogenic oocytes. However in the combination group, a few vitellogenic oocytes were also present except for apoptosis in vitellogenic oocytes. Gene expression studies showed that T and TBTC exposure significantly reduced the expressions of ovarian type aromatase (*cyp19a*) and its upstream regulator *foxl2* ($p < 0.05$), while the combined treatment significantly increased their expressions ($p < 0.05$). Whereas, T induced a higher expression of *P450 11 β* , and TBTC inhibited its expression ($p < 0.05$), while in the fish of combination group, the expression of *P450 11 β* remained unchanged ($p < 0.05$). Besides, the expressions of *20 β HSD* (gene responsible for progesterone production) in fish of T and TBTC groups remained unchanged ($p < 0.05$), while the combination of drugs dramatically up-regulated the expression of *20 β HSD* ($p < 0.05$). In summary, we suggest that, both similar and differential mechanisms were involved in T and TBTC induced ovarian dysplasia and oogenesis arrest.

Key words: testosterone; tributyltin chloride; *Danio rerio*; ovarian development; differential mechanisms

(责任编辑 方 兴)